

## VARIASI NUKLEOTIDA LOKUS 126 pb DAERAH D-LOOP DNA MITOKONDRIA (*mtDNA*) PADA INDIVIDU SEGARIS KETURUNAN IBU

Ahmad Yudianto<sup>a)</sup> dan Indah Nuraini Maskjur<sup>a)</sup>

<sup>a)</sup>Program Magister Forensik Sain Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya

correspondence: Phone: 081330198281, email: yudi4n6sby@yahoo.co.id

### ABSTRACT

The characteristics of mitochondrial DNA (*mtDNA*) can be used to confirm individual and ethnic identity Madurese group of population represents an ethnic group that until presently preserves their ancestral customs in a harmonious co-existence in with their religion and endogamy remains occurring among them.

The purpose of the present study was to determine the presence of the nucleotide variants of 126-bp *mtDNA* D-Loop region in maternally inherited individuals in several generations of Madurese ethnic group that could later be used as the basis for determining the genetic patterns of the Madurese's *mtDNA* in a larger scale. For this purpose, the study carried out nucleotide sequence determination of *mtDNA* D-Loop region on several Madurese individual by using a sample of epithelial cells of oral cavity. A series of activities including isolation of the samples' mitochondrial DNA, PCR amplification of *mtDNA* D-loop region, and sequencing and analysis of the nucleotide sequence of sequencing results was performed in order to determine the nucleotide sequence.

The study successfully performed PCR amplification of the 126-bp fragment of *mtDNA* D-Loop region and determined a 125-bp nucleotide sequence of one Madurese individual. In addition, the study found variants or morphs differing from the Cambridge or Anderson sequences. Ten haplotype were found in different positions; they were 109A→T, 110G→T, 130C→A, 101G→A, 107G→A, 118T→A, 131T→A, 160T→C, and 161T→A. In addition, a C nucleotide substitution was found at position 129.

**Keywords:** Mitochondrial DNA, variants, D-Loop, maternally inherited

### PENDAHULUAN

Identifikasi personal merupakan suatu masalah dalam kasus pidana maupun perdata. Menentukan identitas personal dengan tepat amat penting dalam penyidikan karena adanya kekeliruan dapat berakibat fatal dalam proses peradilan [1]. Identifikasi merupakan bagian dalam kedokteran forensik. Salah satu identifikasi dalam kedokteran forensik yakni dengan cara membandingkan data *antemortem* (AM) dan data *postmortem* (PM).

Metode identifikasi dalam kedokteran forensik antara lain metode asosiatif-konvensional yakni sidik jari (*daktiloskopi*), pemeriksaan *property*, medis, gigi-geligi, serologi dan metode eksklusif. Beberapa kasus kadang sulit dipecahkan melalui penegakan identifikasi asosiatif-konvensional sehingga kadang perlu ditegakkan identifikasi melalui analisis DNA [2]. Identifikasi dengan analisis DNA dimulai sejak tahun 1996 di Amerika Serikat. Sejak saat itu analisis DNA dalam identifikasi memegang peranan penting dalam memecahkan berbagai kasus.

Identifikasi DNA yang melibatkan kromosom somatik, pembandingan yang digunakan adalah ayah dan ibu. Sedangkan pada pemeriksaan DNA mitokondria, pembandingan yang digunakan adalah kerabat dalam satu garis keturunan ibu. Berbagai variasi pembandingan dapat digunakan sesuai jenis kasus, misalnya dapat digunakan pembandingan kakek-nenek, sepupu dan lain-lain, namun tentu saja analisis data yang digunakan sedikit berbeda [3]. Keunikan sistem pewarisan ini telah dimanfaatkan dalam berbagai bidang yaitu penentuan hubungan kekerabatan, studi evolusi dan migrasi global manusia modern, bidang forensik dan identifikasi penyakit genetik [4].

Kelompok penduduk pulau madura merupakan suatu kelompok etnik yang sebagian besar sampai saat ini masih mempertahankan adat istiadat leluhurnya berdampingan selaras dengan agama yang dianutnya. Perkawinan dalam masyarakat di pulau madura pada daerah pelosok terutama daerah kepulauan terkecil madura masih terjadi antara kalangan mereka sendiri (endogami). Perkawinan endogami dilihat dari sudut pandang genetik akan meningkatkan frekuensi geneotip homosisgot. Peningkatan homogenitas genetik ini akan muncul jika perkawinan endogami terjadi terus menerus antar generasi hingga sampai pada satu titik dimana terjadi semua alel homosisgot dalam satu lokus atau bahkan pada semua lokus [3].

Berdasarkan hal tersebut, sangat menarik melakukan penelitian guna menentukan adanya morf atau varian baru pada individu suku pulau Madura (yang berbeda dengan urutan referensi yaitu urutan Cambridge atau Urutan Anderson) [5] yang nantinya dapat digunakan sebagai pijakan dalam menentukan pola genetik *mtDNA* suku madura dalam skala yang lebih besar. Sejauh ini penentuan adanya varian nukleotida *mtDNA* pada individu segaris keturunan ibu dalam beberapa generasi kelompok suku madura belum banyak diketahui.

### BAHAN DAN METODE

Strategi penelitian menerapkan amplifikasi PCR dan sekuensing terhadap fragmen berukuran 126 pb (nt 34-159) daerah D-Loop DNA mitokondria menggunakan sampel sel epitel rongga mulut (buccal swab) dari orang tua, nenek/kakek, cucu, cicit yang segaris keturunan ibu pada kelompok populasi tertentu (Suku

Pulau Madura). Besar sampel yakni 3 keluarga yang masih mempunyai level generasi lengkap segaris keturunan ibu (nenek, kakek, orang tua, anak, cucu, cicit).

### Penanganan Sampel

Tahap awal penelitian adalah penyiapan templat DNA untuk proses PCR. Templat DNA yang akan diamplifikasi berasal dari hasil lisis sel epitel rongga mulut (buccal swab) manusia. Ujung buccal swab dipotong, dimasukkan tabung conical dicampur dengan Water Free, sentrifuge 10.000 g selama 10 menit. Pellet diambil dicampur dengan 1 ml DNAzol sentrifuge 10.000 g selama 10 menit pada suhu 4 °C, kemudian *viscous supernatant* ditambahkan 0,5 ml ethanol absolute (100%) sentrifuge 4.000 g selama 1-2 menit pada suhu 4°C. Cuci pelet dengan ethanol 75% 0,8-1 ml. Larutkan pellet yang berisi DNA tersebut dengan larutan NaOH 8mM sebanyak 0,2-0,3 ml. vortex secukupnya, kemudian disimpan pada suhu -20 °C.

### Amplifikasi PCR

Amplifikasi PCR dengan bahan untuk PCR : PCR Mix (12,5 ul) yang terdiri : dNTP (ATP,CTP,TTT GTP), MgCl<sub>2</sub> dan Taq Polimerase, DW sigma (Nuclease Free water). Primer mtDNA 126 bp ( nt 34-159. HVS II) [5] :

5'- GGG AGC TCT CCA TGC ATT TGG TA-3'

5'- AAA TAA TAG GAT GAG GCA GGA ATC-3'

Pogram Amplifikasi 126 pb mtDNA [7] dilakukan dalam 30 siklus yang terdiri tahap *Initial denaturasi* 95°C selama 3 menit, Denaturasi 94°C selama 1 menit, annealing 56°C selama 1 menit extension 72°C selama 1 menit final extension 72°C selama 3 menit. Hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 2% (b/v).

Proses sekuensing dilakukan menurut prosedur ABI PRISM DNA Sequencing [8]. Reaksi metoda dye terminator ini meliputi beberapa tahap, yaitu penyiapan templat DNA, proses PCR, pemurnian DNA menggunakan kolom sephadex G-50, elektroforesis gel akrilamid, pembacaan elektroforegram dan analisis hasil sekuensing. Pembacaan hasil elektroforesis dilakukan secara otomatis oleh alat ABI PRISM DNA Sequencer.

Hasil PCR yang positif dimurnikan (*purification*), DNA Quantity, Preparing/labeling, purifying extension product/*precipitation* kemudian di sekuensing dengan tahapan Pemurnian (*purification*) dan visualisasi (*DNA Quantity*), Preparing/labeling, *Purifying Extension Product*

### Analisis sekuensing

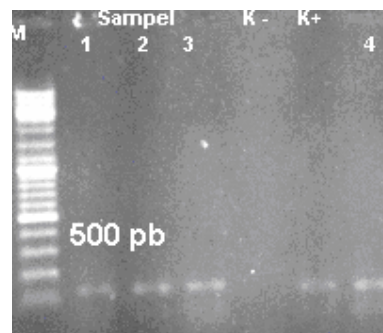
Tiap nukleotida menghasilkan puncak dengan warna yang berbeda pada elektroforegram yaitu nukleotida A berwarna hijau, nukleotida G berwarna hitam, nukleotida C berwarna hijau, dan nukleotida T berwarna merah. Analisis hasil urutan nukleotida

untuk penentuan adanya varian atau morf baru dibandingkan dengan urutan atau urutan Cambridge dilakukan dengan menggunakan program *DNA-STAR*. Data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan *probability of iddentity* (frekuensi), studi homologi urutan nukleotida antar individu serta dibandingkan terhadap urutan CRS atau anderson [5].

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil amplifikasi PCR

Hasil ekstraksi/isolasi DNA dari epitel rongga mulut ternyata mampu menghasilkan lisat sel yang siap untuk digunakan sebagai template PCR. Proses PCR menggunakan primer pada daerah *Hipervariable region* (HV)II D-Loop (nt 59-134), berhasil memperoleh satu pita terang berukuran 126 bp seperti tampak pada gambar 1. Pita 126 pb adalah pasangan primer yang bersifat spesifik hanya menempel pada posisi yang diharapkan (nt 59-134).



Gambar 1. Visualisasi hasil PCR 126 bp

### Sekuensing

Untuk penentuan urutan nukleotida produk PCR yang berukuran 126 bp dalam reaksi sekuensing digunakan primer M1, penelitian ini telah berhasil menentukan urutan nukleotida daerah D-Loop mtDNA dari sampel seperti terlihat pada gambar 2.

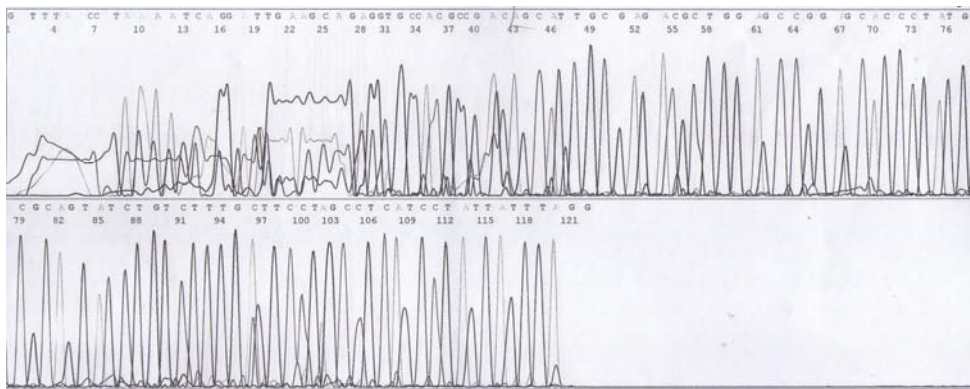
Urutan nukleotida HVS II (rCRS): nt 34-159: >gi|251831106:34-159. Homo sapiens mitochondrion, complete genome

GGGAGCTCTCCATGCATTTGGTATTTTCGTCTG  
GGGGGTATGCACGCGATAGCATTGCGAGACGC  
TGGAGCCGGAGCACCTATGTCGCACTATCTG  
TCTTTGATTCTGCCTCATCCTATTATT

### Hasil Analisis Homologi

Hasil analisis homologi urutan nukleotida sampel terhadap urutan rCRS (reanalysis Cambridge Reference Sequence [9] sebagai urutan referensi (Tabel 1), menunjukkan bahwa ditemukan 13 jenis varian atau morf semua pada level cicit yang berbeda dengan rCRS.

Dari tabel 2 diatas menunjukkan adanya 10 varian atau morf (haplotype) yang berbeda yakni 109A→T, 130C→A, 129→C, 101G→A, 107G→A, 118T→A, 131T→A, 160T→C, 161T→A, 110G→T dan substitusi nukleotida C posisi 129.



Gambar 2. Elektroforegram hasil sekuensing

Tabel 1 . Urutan nukleotida sampel

**Keluarga I**

Level Keluarga	URUTAN NUKLEOTIDA		
Generasi 1	85: AGCATTGCGAGACGCT	101: GGAGCCGGAGCACCC	116: TATGTCGCAGTAT-C
	131: TGTCTTTGATTCTG	146: CCTCATCCTATTATT	161: T
Generasi 2	85: AGCATTGCGAGACGCT	101: GGAGCCGGAGCACCC	116: TATGTCGCAGTAT-C
	131: TGTCTTTGATTCTG	146: CCTCATCCTATTATT	161: T
Generasi 3	85: AGCATTGCGAGACGCT	101: GGAGCCGGAGCACCC	116: TATGTCGCAGTAT-C
	131: TGTCTTTGATTCTG	146: CCTCATCCTATTATT	161: T
Generasi 4	85: AGCATTGCGAGACGCT	101: GGAGCCGGTGCACCC	116: TATGTCGCAGTAT-C
	131: TGTCTTTGATTCTG	146: CCTCATCCTATTATT	161: T

**Keluarga II**

Level Keluarga	URUTAN NUKLEOTIDA		
Generasi 1	85: AGCATTGCGAGACGCT	101: GGAGCCGGAGCACCC	116: TATGTCGCAGTAT-C
	131: TGTCTTTGATTCTG	146: CCTCATCCTATTATT	161: T
Generasi 2	85: AGCATTGCGAGACGCT	101: GGAGCCGGAGCACCC	116: TATGTCGCAGTAT-C
	131: TGTCTTTGATTCTG	146: CCTCATCCTATTATT	161: T
Generasi 3	85: AGCATTGCGAGACGCT	101: GGAGCCGGAGCACCC	116: TATGTCGCAGTATCA
	131: TGTCTTTGATTCTG	146: CCTCATCCTATTATT	161: T
Generasi 4	85: AGCATTGCGAGACGCT	101: GGAGCCGGAGCACCC	116: TATGTCGCAGTAT-C
	131: TGTCTTTGATTCTG	146: CCTCATCCTATTATT	161: T

**Keluarga III**

Level Keluarga	URUTAN NUKLEOTIDA		
Generasi 1	85: AGCATTGCGAGACGCT	101: GGAGCCGGAGCACCC	116: TATGTCGCAGTAT-C
	131: TGTCTTTGATTCTG	146: CCTCATCCTATTATT	161: T
Generasi 2	85: AGCATTGCGAGACGCT	101: GGAGCCGGAGCACCC	116: TATGTCGCAGTAT-C
	131: TGTCTTTGATTCTG	146: CCTCATCCTATTATT	161: T
Generasi 3	85: AGCATTGCGAGACGCT	101: AGAGCCAGAGCACCC	116: TAAGTCGCAGTAT-C
	131: AGTCTTTGATTCTG	146: CCTCATCCTATTATC	161: A
Generasi 4	85: AGCATTGCGAGACGCT	101: GGAGCCGGATCACCC	116: TATGTCGCAGTATCC
	131: TGTCTTTGATTCTG	146: CCTCATCCTATTATT	161: T

Keterangan : Huruf dicetak warna merah menunjukkan adanya varian nukleotida

Tabel 2. Data varian normal daerah D-Loop mtDNA terhadap rCRS yang ditemukan pada sampel

Tabel 2: Data varian normal dengan 3 Loop rCRS terhadap rCRS yang ditemukan pada sampel											
Keluarga 1			Keluarga 2			Keluarga 3					
POSISI	109	129	130	101	107	118	131	160	161	110	129
rCRS	A	-	C	G	G	T	T	T	T	G	-
Generasi 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Generasi 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Generasi 3	-	C	A	A	A	A	A	C	A	-	-
Generasi 4	T	-	-	-	-	-	-	-	-	T	C

rCRS : reanalysis Cambridge Reference Sequence [9]

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya 10 varian nukleotida yang ditemukan pada 3 keluarga segaris ibu suku madura. Ke sepuluh varian tersebut merupakan spesifik untuk suku madura yang bermukim di pulau madura, karena sejauh ini penelitian varian nukleotida daerah D-Loop mitokondria NA (mtDNA) belum banyak dilakukan terutama pada lokus 126 pb.

Populasi suku madura dapat dikelompokkan menjadi 2 kelompok besar, yakni mereka yang tinggal di pulau madura dan mereka yang merantau ke pulau jawa (pantura-tapal kuda). Meski kebanyakan wilayah yang termasuk kawasan Madura adalah kepulauan, namun Madura tetap memiliki kebudayaan tersendiri. Orang Madura sejak masa lalu sudah berani merantau ke luar pulau. Hal ini terbukti dengan banyaknya orang Madura yang tersebar hampir di seluruh penjuru Negeri bahkan sampai-sampai di luar negeri pun ada.

Dalam penelitian ini sampel/sukarelawan yakni mereka yang asli kelahiran madura serta pola perkawinannya endogami, sesama orang dari suku madura. Namun dengan perkembangan teknologi serta sarana transportasi yang memadai sehingga pola perkawinan endogami mulai menurun. Hal ini bisa dilihat pola varian nukleotida penelitian ini menunjukkan varian banyak terjadi pada level generasi 3-4. Dalam penelitian populasi sangat penting untuk mengetahui dengan jelas proses sampling agar didapatkan ketepatan donor DNA beserta silsilah nenek moyangnya [10].

Terdapat empat mekanisme utama yang dapat merubah frekuensi gen dan genotip dalam populasi yaitu mutasi, seleksi, *gene flow* dan *genetic drift*. Mutasi dan *gene flow* akan menaikkan variasi dalam populasi. *Gene flow* adalah pertukaran material genetik antar populasi yang disebabkan oleh proses migrasi dan perkawinan. Dalam hasil penelitian ini masih perlu penelitian lebih lanjut tentang varian hasil penelitian ini serta termasuk haplotipe atau haplogroup tertentu [11].

*Genetic drift* terjadi pada populasi di daerah yang tertutup atau terisolasi atau sedikit menerima migrant dari daerah lain. Terdapat dua keadaan yang dapat memicu *genetic drift*, yakni *bottleneck* dimana ukuran populasi berkurang pada suatu saat tertentu dan *founder effect* dimana semua individu dalam suatu populasi setelah ditelusuri ternyata kembali ke sejumlah kecil individu asalnya [12]. Perbedaan urutan basa yang ditemukan pada sekelompok individu dalam suatu spesies disebut dengan 'genetic marker' (penanda gen). 2 individu yang memiliki genetic marker pada posisi yang sama mengindikasikan hubungan kekerabatan. Dari sinilah kita bisa menelusuri leluhur kita sesungguhnya dan darimana mereka berasal. Semakin banyak genetic marker khas yang terdapat dalam suatu ras atau spesies, makin beragam karakteristik individu penyusunnya.

Keragaman genetik (*Genetic diversity*) semakin berkurang dengan adanya migrasi. Ketika sekelompok kecil dari nenek moyang kita bermigrasi ke daerah baru, pada dasarnya mereka membawa dalam diri mereka sampel yang lebih kecil dari *genetic diversity* komunitas asal.

Studi menunjukkan bahwa benua Afrika memiliki *genetic diversity* tertinggi di muka bumi. *Genetic marker* dari ras-ras yang ada di seluruh dunia, baik Eropa maupun Asia, bersumber dari Afrika. Gen Afrika mengandung genotip yang berpotensi memunculkan ras-ras lain yang sama sekali berbeda dari mereka. Ketika sebagian dari mereka keluar dari tempat tinggalnya dan terpapar oleh lingkungan yang baru, maka dalam jangka waktu tertentu akan timbul mutasi yang akan merubah susunan basa dalam gen, membuat genotip berubah menjadi fenotip dan membuat mereka rentan terhadap penyakit tertentu.

Dalam evolusi manusia menurut teori klasik disebabkan oleh faktor eksternal seperti iklim, geografis dan topologi, namun penelitian dalam antropologi dewasa ini menyatakan bahwa perubahan budaya merupakan faktor yang potensial untuk merubah suatu lingkungan dan kebiasaan sehingga memicu evolusi yang cepat yang disebabkan oleh interaksi antara genetic dan budaya. Hal ini terlihat pada penelitian ini dari level generasi 3-4 sudah ada varian nukleotida.

Penelitian ini belum bisa menentukan pola varian nukleotida hasil sekuensing 4 generasi dalam 3 keluarga pada suku madura apakah merupakan spesifik untuk suku madura oleh karena jumlah sampel yang masih sedikit. Hasil penelitian ini merekomendasikan bahwa penelitian tentang populasi ataupun bidang medis lainnya tidak hanya terfokus pada genetic saja, tetapi juga memperhatikan faktor budaya dan adat istiadat suatu populasi. Gene pool bukan hanya merupakan suatu kumpulan gen tetapi merupakan suatu system dinamis yang terorganisir dan memuat sejarah masa lalu dari suatu populasi [13]. Setiap informasi genetic mempunyai aspek sejarah, antropologi dan statistic tertentu sehingga diperlukan koordinasi dan kolaborasi dari berbagai disiplin ilmu.

## KESIMPULAN

Dalam penelitian telah berhasil melakukan analisis pada fragmen mtDNA berukuran 126 bp pada daerah *D-Loop* yang terletak pada daerah nukleotida 59-134 dari satu individu suku madura telah berhasil diamplifikasi dengan teknik PCR. Serta asil analisis homologi urutan nukleotida sampel dengan rCRS didapatkan 10 jenis varian nukleotida yakni : 109A→T, 130C→A, 129→C, 101G→A, 107G→A, 118T→A, 131T→A, 160T→C, 161T→A dan 110G→T.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1]. Idries Abdul M, 1997. Pedoman Ilmu Kedokteran Forensik. Edisi pertama. Bina Rupa Jakarta, hal : 12-15
- [2]. Kusuma SE, Sosiawan A, 2004, Efek temperature ekstrim pada DNA inti dan DNA mitokondria, Penelitian pendahuluan, Lembaga Penelitian UNAIR
- [3]. Syukriani Y, 2012. DNA Forensik. PT Sagung Jakarta.
- [4]. Wallace, D.C. 1997, Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease and aging. American Journal of Human Genetic. 57, p 201-223
- [5]. Anderson, S., et al. 1999. Sequence and organization of the human mitochondrial genome, Nature, 290, pp 457-465
- [6]. Gabriel MN, Huffine EF, Ryan JH, Holland MM, Parsons TJ, 2001. Improved mtDNA sequence analysis of forensic remains using a "mini-primer" set amplification strategy; *J Forensic Sci* 46: pp 247-249.
- [7]. Morowatil S, Mahasti M, Ghلامreza H, Yaser K, Ali K, Ali Asghar P, 2007, Sequence analysis of mtDNA Hypervariable region : An approach to personal identification. Arch of Med. Rescr. 38; 345-349
- [8]. Perkin Elmer, 1995, Sequence mtDNA methode. Biotech. Willey Lisc pp 234-239
- [9]. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM and Howell N 1999, Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Nat Genet 23; 147
- [10]. Pena JA, Gracia-Obregon S, Perez-Miranda AM, de Pancorbo MM, and Alfonso-Sanchez MA, 2006. Gene Flow in the Iberian Peninsula Determined from Y-chromosome STR Loci, American Journal of Human Biology, 18 : pp 532-539
- [11]. Stinson S, Bogin B, Hush-Ashmore R, O'Rourke D, 2000. Human Biology, An Evolutionary and Biocultural Perspective. New York : Willey-Liss, pp. 4-7
- [12]. Bodmer WF, Cavalli-Sforza LL, 1976. Genetics, Evolution and Man. San Fransisco; WH Freeman and Company
- [13]. Mastana S, 2007. Molecular Antropology.: Population and Forensic Genetic Applications. Anthropologist Special Volume 3 : 373-383